

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian dengan judul Total Bakteri Asam Laktat, Nilai pH dan Daya Lekat (*Adhesiveness*) Susu Bifidus Berbahan Baku Susu dari Peternakan yang Berbeda dengan penambahan ekstrak buah telah dilaksanakan. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2013 sampai dengan April 2014 di Laboratorium Kimia dan Gizi Pangan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang.

3.1. Materi Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain susu segar yang diperoleh dari peternakan di daerah Gedawang (peternakan A) dan Salatiga (peternakan B), *Bifidobacterium longum* ATCC 1570, ekstrak buah (alpukat, kelengkeng, salak), susu *Ultra High Temperature* (UHT), alkohol, aquades, serta *Man Ragosa and Sharp* (MRS) Broth. Alat yang digunakan adalah autoklaf, inkubator, *sentrifuge*, mortal, termometer, mikro pipet, *micro tube*, *centrifuge tube* 15 ml, timbangan elektrik, aluminium foil, kain penyaring, pH meter elektronik, erlenmeyer, *petri film*, gelas ukur, gelas beker, serta *texture analyzer*.

3.2. Metode Penelitian

Metode penelitian ini meliputi persiapan penelitian, termasuk di dalamnya pembuatan rancangan percobaan, penghitungan alat dan bahan serta sterilisasi

alat, bahan dan ruangan. Kegiatan selanjutnya, yaitu pembuatan starter kerja, pembuatan susu bifidus dengan penambahan ekstrak buah. Kegiatan terakhir, yaitu pengujian susu bifidus dengan penambahan ekstrak buah berdasarkan parameter dan analisis data.

3.2.1. Persiapan penelitian

Semua alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian dipersiapkan terlebih dahulu. Kegiatan tersebut meliputi sterilisasi alat dan bahan serta bahan yang sudah dihitung komposisinya disiapkan. Kemudian semua bahan ditimbang sesuai dengan komposisi perlakuan. Meja yang akan digunakan untuk proses pembuatan susu bifidus disemprot dengan alkohol 70%.

3.2.2. Metode pembuatan kultur kerja *Bifidobacterium longum* ATCC 15707

Pembuatan starter kerja *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 yaitu starter yang berupa agar miring dibiakkan dalam media *MRS Broth* sebanyak 5 ml, lalu dihomogenkan dengan menggunakan *fortage* dan kemudian mengambil sebanyak 1 ml untuk ditambahkan kedalam 9 ml *MRS Broth* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (F1). Untuk menjadikan starter kerja dengan melakukan peremajaan dari F1 ke F2 dengan mengambil 1 ml F1 dan dimasukkan kedalam 9 ml *MRS Broth* dan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (F2). Peremajaan dilakukan setiap hari selama kegiatan penelitian. Selanjutnya dikondisikan F2 menggunakan media susu dengan ditambahkan 10% F2 ke dalam 100 ml susu *Ultra High Temperature* (UHT) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 6 jam sehingga didapatkan F3. F3 merupakan starter kerja dengan pH 5,2-

5,3 dengan kepadatan starter 10^6 - 10^7 CFU/ml (Reilly and Gilliland, 1999 dengan modifikasi)

3.2.3. Metode pembuatan ekstrak buah

Proses pembuatan ekstrak buah yaitu buah tanpa biji ditimbang 500 g. Kemudian dihaluskan dengan mortal. Ekstrak buah yang telah halus difilter dengan menggunakan kain filter rangkap 2 dan dilakukan sentrifugasi menggunakan sentrifuge 6000 rpm selama 10 menit lalu kemudian diambil supernatnya (Hartati *et al.*, 2012 dengan modifikasi)

3.2.4. Metode pembuatan susu bifidus dengan ekstrak buah

Proses pembuatan susu bifidus yaitu dilakukan dengan susu segar ditambahkan ekstrak buah lalu diberi perlakuan *Lactoperoxidase System* guna mensterilisasi susu segar dan ekstrak buah yang digunakan tanpa mengurangi cita rasa dari buah yang digunakan. Penambahan *Lactoperoxidase System* ini dapat mengurangi jumlah bakteri patogen sampai 2 log (Villa *et al.*, 2014). Proses ini juga merujuk pada Nawangsari *et al.* (2014), campuran *lactoperoxidase system* dibuat dari LPO (*Lactoperoxidase*), KSCN dan H_2O_2 .

Perbandingan LPO, KSCN dan H_2O_2 yang digunakan yaitu $1/2:1/4:1/4$ dalam 20% bagian dari susu dan ekstrak buah yang akan disterilkan, kemudian larutan tersebut ditunggu kurang lebih 60 menit. Campuran LPO, KSCN dan H_2O_2 dimasukkan ke dalam 80% bagian susu segar dan ekstrak buah selama 30 menit. Setelah itu susu diinokulasi dengan starter yang telah dipersiapkan sebelumnya

sebanyak 10% v/v starter *B. longum* ATCC 15707 dengan kepadatan starter 10^6 - 10^7 CFU/ml. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 9 jam hingga jumlah bakteri mencapai 10^7 - 10^8 CFU/ml dan pH 5,2-5,3. Susu fermentasi disimpan dalam refrigerator dengan suhu 5°C .

3.3. Metode Variabel Penelitian

Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah total BAL, nilai pH dan *adhesiveness* susu bifidus dengan penambahan ekstrak buah sebanyak 10% dari volume susu. Prosedur pengujian variabel tersebut akan dijelaskan lebih lanjut.

3.3.1. Metode pengujian total BAL

Perhitungan total BAL dilakukan dengan total BAL yang tumbuh dihitung pada media biakan *Man Rogosa and Sharpe* (MRS) (Fardiaz, 1993). Penghitungan total BAL diawali dengan sampel diencerkan dalam aquades steril dengan perbandingan 1:9. Pengenceran dilakukan dari 10^1 - 10^5 , pada pengenceran pertama sebanyak 0,1 ml sampel diencerkan ke dalam 0,9 ml aquades steril, pengenceran kedua dilakukan dengan 0,1 ml yang sudah diencerkan pada pengenceran pertama dimasukkan ke dalam 0,9 ml aquades steril, pengenceran ketiga dan seterusnya dilakukan dengan cara yang sama seperti pengenceran kedua lalu kemudian 0,1 ml sampel hasil pengenceran terakhir dimasukkan ke dalam petri film yang sudah berisi MRS agar. Setelah itu petri film tersebut dilapisi plastik untuk mengkondisikan suasana anaerob lalu diinkubasi pada suhu

37°C selama 48 jam, kemudian dilakukan penghitungan jumlah koloni bakteri asam laktat.

3.3.2. Metode pengujian nilai pH

Pengujian pH dilakukan dengan pH meter elektronik. Ujung katoda indikator pH meter elektronik dicuci dengan aquades, kemudian dibersihkan dengan tissue. pH meter elektronik dikalibrasi dengan ujung katoda dicelupkan ke dalam larutan *buffer* 4 dan 7 (Wahyudi, 2006). Ujung katoda dicelupkan dalam sampel. Hasil pengukuran dibaca pada pH meter.

3.3.3. Metode pengujian *adhesiveness*

Pengujian terhadap *adhesiveness* dilakukan dengan menggunakan alat *Texture Analyzer* seri CT-3 dari Brookfield Engineering USA. Berdasarkan pada petunjuk penggunaan alat *texture analyzer* CT-3 (Brookfield, 2014), pertama yang dilakukan yaitu memasang *spherical probe* pada *texture analyzer* dengan berat 5 g. Kemudian, mengatur alat dengan ketentuan sebagai berikut: mode (TPA), trigger (0,5 g), deformation (1,0 mm), speed (1,0 mm/s). Langkah selanjutnya yaitu menuangkan sampel susu sebanyak 5 ml kedalam gelas beker dengan ukuran 10 ml. Pengukuran *adhesiveness* dimulai dengan menekan tombol start dan nilai *adhesiveness* akan muncul tertera pada layar alat lalu kemudian mencatat hasil pengujian. Pengujian ini dilakukan sebanyak 3 kali.

3.4. Analisis Data

Data penelitian yang sudah diperoleh kemudian di analisis menggunakan uji-t (Petrie and Wotson, 1999). Data yang diperoleh kemudian dianalisis untuk membandingkan dua peternakan yang berbeda yaitu di daerah Gedawang (A) dan Salatiga (B).

Homogenitas data penelitian perlu diuji dengan menggunakan uji F terlebih dahulu sebelum dilakukan perhitungan dengan uji-t. Jika varian homogen , maka rumus yang digunakan untuk uji-t adalah sebagai berikut :

$$t - \text{hitung} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{Sp \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Keterangan :

\bar{x}_1 dan \bar{x}_2 = rata-rata hitung kelompok I dan II
 n_1 dan n_2 = jumlah anggota kelompok I dan II
 Sp = simpangan baku gabungan

Jika varian non homogen, rumus yang digunakan adalah sebagai berikut :

$$t - \text{hitung} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{S^2 X_1}{n_1} + \frac{S^2 X_2}{n_2}}}$$

Keterangan :

\bar{x}_1 dan \bar{x}_2 = rata-rata hitung kelompok I dan II
 n_1 dan n_2 = jumlah anggota kelompok I dan II
 Sp = simpangan baku kelompok I dan II

Hipotesis statistik pada penelitian adalah sebagai berikut :

$H_0 : x_1 = x_2$; tidak ada perbedaan total bakteri asam laktat, nilai pH, dan daya lekat (*Adhesiveness*) pada peternakan A dan peternakan B

$H_0 : x_1 \neq x_2$; terdapat perbedaan total bakteri asam laktat, nilai pH, dan daya lekat (*Adhesiveness*) pada peternakan A dan peternakan B

Kriteria Pengujian

Jika $t_{\text{hitung}} \leq t_{\text{tabel}}$ maka H_0 diterima dan H_1 ditolak

Jika $t_{\text{hitung}} > t_{\text{tabel}}$ maka H_0 ditolak dan H_1 diterima